

Oponentský posudek na diplomovou práci

Michaely Urbanové

“Studium Ser/Thr proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz *Pseudomonas aeruginosa*”

K obhajobě je předkládána kvalitní diplomová práce; jinak ani nelze, neboť se jedná o dílo, které vzniklo v jedné ze špičkových laboratoří MBÚ AV ČR, v Laboratoři buněčné signalizace, vybudované RNDr. Pavlem Brannym, CSc., který byl i školitelem Michaely Urbanové.

Práce se zabývá významným tématem současné mikrobiologie, přenosem signálu Ser/Thr proteinkináz eukaryotního typu v prokaryotech, zde konkrétně v *Pseudomonas aeruginosa*. Tento podmíněný patogen a původce nebezpečných nosokomiálních infekcí vlastní Ser/Thr proteinkinázy i fosfoproteinfosfatázy, u nichž se předpokládá účast v kontrole virulence. Cílem diplomové práce byla příprava expresních plazmidů pro proteinkinázy Stk1 a PpkA a fosfoproteinfosfatázy Stp1 a PppA, nadprodukce a izolace těchto enzymů v *E. coli*, biochemická charakterizace proteinkinázy Stk1, fosfatázy PppA a průkaz in vitro interakce páru kinázy Stk1 a fosfatázy Stp1. Lze konstatovat, že cílů vytčených v diplomové práci bylo v podstatě dosaženo a práce přináší původní a jistě publikovatelné výsledky a obohacuje dosavadní znalosti o uvedených enzimech.

Diplomová práce v rozsahu 95 stran má klasické členění. Přehled literatury na 38 stranách pojednává soustavně téma fosforylace proteinů a její role v signalizaci prokaryotních buněk s potřebným přesahem na eukaryota. Je škoda, že tato kapitola nezahrnuje i nejnovější práce, zatímco dva obrázky z r. 2006 text vhodně doplňují.

Metodická část dokládá, že M. Urbanová zvládla úctyhodné množství metod, počínaje molekulárně genetickými přístupy, přes biochemické separační techniky DNA, proteinů, imunodetekci, až po enzymologická stanovení. Formálně tato část na 27 stranách pojednává materiál a metody odděleně, popis je přehledný a pečlivý.

Kapitola Výsledky, v rozsahu 17 stran, v části popisující přípravu produkčních kmenů, je psaná jasně a je doplněna přesnými obrázky plazmidových konstruktů pro klonování genů proteinkináz a proteinfosfatáz. Taktika konstrukce cílových genů s Histidinovou kotvou na N-konci nebo na C-konci fúzovaného proteinu byla úspěšná, podařilo se tak získat enzymy s vysokými aktivitami. Byla navíc prokázána stimulace autofosforylace Stk1 Mg^{2+} a Mn^{2+} ionty, o řád vyšší než Ca^{2+} ionty. Překvapivé je zjištění, že in vitro dosahuje proteinkináza Stk1 maximální aktivity, pokud reakce probíhá 2,5 hodiny, ale ještě po 20 hodinách je enzym stejně aktivní jako ve 45. minutě reakce; vypovídá to o jeho vysoké stabilitě. Část popisující biochemickou charakterizaci a interakci enzymů Stk1 a Stp1, stejně jako charakterizaci fosfoproteinfosfatázy PppA dokumentuje výsledky pěknými obrázky gelů a přehlednými grafy. Pouze u Obr. 5.8. na str. 64 (gel 1D SDS – PAGE) není jasná legenda, konkrétně jaký je rozdíl mezi stopou č. 1 : hrubý extrakt (HE) – Stk1; a stopou č.2 : HE – pET42b, atd.

Diskuse na 4,5 stranách je členěna analogicky jako kapitola Výsledky. Plní své poslání, pokud se jedná o interpretaci a vysvětlení vlastních výsledků. Diskuse těchto dat v kontextu světové literatury je sporadická, přestože se jedná o téma ve světě, ale i ve vlastní laboratoři publikované a nepochybně zajímavé. Michaela Urbanová se tak ochudila o možnost zdůraznit význam vlastních výsledků.

K přehlednosti diplomové práce přispívají stručně formulované Cíle práce a jim odpovídající Souhrn, obě kapitoly v rozsahu jedné strany textu. Práci doplňuje velmi obsáhlá bibliografie, obsahující 152 citací.

K diplomové práci mám několik otázek, které prosím, aby autorka zodpověděla.

1. Na str. 55 je popsána metoda defosforylace in vitro. Co bylo použito jako substrát proteinfosfatázy PppA v komerční sadě od firmy Promega?
2. Proč se podle Vašeho názoru nepodařilo připravit expresní plazmid pET 42b pro ppkA, respektive expresní kmen E.coli BL21(DE3) s tímto plazmidem?
3. Je známa lokalizace proteinů Stk1, Stp1 a PppA v buňce? Podle Vašich Obr. 5.8., Obr. 5.12 a 5.14 lze usuzovat, že v nerozpustné frakci je mnohem více těchto proteinů než ve frakci cytoplazmatické.
4. U obrázku 5.18 - závislost aktivity fosfatázy PppA na teplotě není uvedeno pH, při němž stanovení probíhalo, u Obr. 5.19 - závislost aktivity PppA na pH není uvedena teplota, při níž bylo stanovení provedeno.
5. Obr. 5.13. - kontrola, aktivita proteinkinázy Stk1 klesá od 60. min., V Obr. 5.11. naopak aktivita Stk1 stoupá a dosahuje maxima ve 150 minutě. Proč?
6. Jakých aktivit dosahují obě studované proteinkinázy v Pseudomonas aeruginosa, ve srovnání s enzymy exprimovanými v E. coli?
7. Je interakce Stk1 s Stp1 Vaším objevem nebo je to ověření již publikovaného pozorování? Z Úvodu ani z Výsledků to jasně nevyznívá.

Po formální stránce je práce psána pečlivě, bez překlepů, grafické zpracování je úhledné. Přesto se však autorka neubrání anglikanizmům typu: "Proteinkináza Stk1 je hořčík a mangan dependentní na str. 76, termínem "prekultura" na str. 47 je jistě míněno inokulum. O mezerách v chemickém vzdělání svědčí na str. 70 v Obr. 5.16 popis osy x, který zní: "dvoumocný kationt", místo správného "dvojmocný kation". Do souladu prosím uvést konstatování na str. 74, kde je P. aeruginosa označena jako obligátní patogen, zatímco na str. 9. jako podmíněný patogen. Na Obr. 5.21 je patrně vynášena závislost $1/V$, rychlost fosfatázové reakce katalyzované enzymem PppA, na $1/s$, tedy na převrácené hodnotě koncentrace substrátu. Na ose Y je tedy třeba doplnit, za jaký čas a na jaké množství proteinu je množství uvolněného substrátu vztaženo; patrně za min/ μ g proteinu, jak je uvedeno v textu. A snad poslední formální poznámka - v popisu metod je používáno 1. osoby množného čísla: Např. "Supernatant jsme odsáli a buňky resuspendovali, dobře promíchali a inkubovali." Lépe asi zní trpný rod.

Přes uvedené drobné výtky považuji práci za zdařilou, splňující zadané úkoly. Při jejím řešení diplomantka prokázala schopnost k samostatné vědecké práci. Doporučuji proto předloženou diplomovou práci jako podklad k získání titulu magistra. *přijmout*

V Praze, dne 22. 9.2007

Doc. RNDr. Jaroslava Svobodová, CSc.